

УДК 577.32:66.094.1:543.51

РЕДОКС-ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С АМИНОКИСЛОТОЙ ЦИСТЕИНОМ КАК ОДИН ИЗ ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО**В.С. Шелковский¹, М.В. Косевич^{1,2}, О.А. Боряк¹, В.Г. Зобнина¹,
А.М. Плехотниченко¹**¹Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина

Национальной академии наук Украины, пр. Науки 47, Харьков, 61103, Украина

²Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы 4, Харьков, 61022, Украина

e-mail: shelkovsky@ilt.kharkov.ua

Надійшла до редакції 26 травня 2017 року

Прийнята 2 червня 2017 року

Одним из актуальных направлений исследований, связанных с разработкой способов борьбы с нейродегенеративными заболеваниями, является поиск веществ-ингибиторов агрегации определенных белков, нарушающей функционирование нервных клеток. В рамках молекулярно-биофизической проблемы установления молекулярных механизмов действия фармакологических препаратов, на модельной системе *in vitro* проведено исследование редокс-взаимодействия метиленового синего как перспективного препарата для предотвращения болезни Альцгеймера с его потенциальной мишенью – аминокислотой цистеином, входящей в состав активного участка Тау-белков. С помощью вторично-эмиссионной масс-спектрометрической методики идентифицирован единственный продукт прямого окисления цистеина метиленовым синим – цистин, образующийся путем формирования дисульфидного мостика между двумя молекулами цистеина. Предполагается, что подобная модификация остатков цистеина в составе Тау-белков меняет их структуру, что может препятствовать их последующей агрегации. Кислородсодержащие продукты окисления цистеина не обнаружены. Показано, что восстановление метиленового синего в ходе реакции переводит его в лейко-форму, которая также рассматривается в качестве агента в терапии нейродегенеративных заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: молекулярные механизмы, метиленовый синий, цистеин, цистин, дисульфидные мостики, Тау-белки, болезнь Альцгеймера, вторично-эмиссионная масс-спектрометрия.

РЕДОКС-ВЗАЄМОДІЯ З АМІНОКИСЛОТОЮ ЦИСТЕЇНОМ ЯК ОДИН З МОЖЛИВИХ МЕХАНІЗМІВ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЬОГО**В.С. Шелковський¹, М.В. Косевич^{1,2}, О.А. Боряк¹, В.Г. Зобніна¹,
О.М. Плехотніченко¹**¹Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України, пр. Науки, 47,
Харків, 61103, Україна²Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи 4, Харків, 61022, Україна

Одним з актуальних напрямів досліджень, пов'язаних із розробкою засобів боротьби з нейродегенеративними захворюваннями, є пошук речовин-інгібіторів агрегації певних білків, яка порушує функціонування нервових клітин. В межах молекулярно-біофізичної проблеми встановлення молекулярних механізмів дії фармакологічних препаратів, на модельній системі *in vitro* проведено дослідження редокс-взаємодії метиленового синього, як перспективного препарату для запобігання хвороби Альцгеймера, з його потенційною мішенню – амінокислотою цистеїном, що входить до складу активної ділянки Тау-білків. За допомогою вторинно-емісійної мас-спектрометричної методики ідентифіковано єдиний продукт прямого окислення цистеїну метиленовим синім – цистин, що утворюється шляхом формування дисульфідного містка між двома молекулами цистеїну. Ймовірно, що подібна модифікація залишків цистеїну в складі Тау-білків змінює їх структуру, що може запобігати їх наступній агрегації. Кисеньвмісні продукти окислення цистеїну не виявлено. Показано, що відновлення метиленового синього у ході реакції переводить його у лейко-форму, котра також розглядається як агент в терапії нейродегенеративних захворювань.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: молекулярні механізми, метиленовий синій, цистеїн, цистин, дисульфідні містки, Тау-білки, хвороба Альцгеймера, вторинно-емісійна мас-спектрометрія.

REDOX INTERACTIONS OF METHYLENE BLUE WITH CYSTEINE AMINO ACID AS A POSSIBLE MECHANISM OF BIOLOGICAL ACTION OF THE DYE**V.S. Shelkovsky¹, M.V. Kosevich^{1,2}, O.A. Boryak¹, V.G. Zobnina¹, A.M. Plokhotnichenko¹**¹*B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 47 Nauky Ave., Kharkiv, 61103, Ukraine*²*V.N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine*

Design of the inhibitors of the pathogenic protein aggregation, associated with the neural cell damage, is of great importance for the therapy of the neurodegenerative diseases. In this work redox interactions of methylene blue as a potential drug against Alzheimer's disease with its potential target – cysteine of the active site of Tau proteins, have been studied *in vitro*, in order to establish the molecular mechanism of methylene blue biological action. First, a single product of direct oxidation of cysteine by methylene blue, viz. cystine, possessing a disulfide bridge between two cysteine molecules, has been detected by mass spectrometry. Such modification of cysteine residues was suggested to affect secondary structure of Tau-proteins, hampering amyloid fibril formation. Notably, we failed to detect any oxygen-containing products of cysteine oxidation. Finally, reduction of methylene blue in the above reaction resulted in the formation of its leuco form, which could be also considered as a potential drug in the therapy of neurodegenerative diseases.

KEY WORDS: molecular mechanisms, methylene blue, cysteine, cystine, disulphide bridges, Tau-proteins, Alzheimer's disease, secondary emission mass spectrometry.

Данное исследование посвящено установлению результатов редокс-взаимодействия красителя метиленового синего с аминокислотой цистеином как одного из предполагаемых механизмов биологического действия данного красителя, рассматриваемого, в частности, при разработке лекарственных препаратов против нейродегенеративной болезни Альцгеймера.

Увеличение продолжительности жизни в связи с успехами в профилактике и лечении инфекционных и сердечнососудистых заболеваний обусловило новый вызов поиска методов борьбы с геронтологическими и нейродегенеративными проблемами, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона [1, 2]. Проблема усугубляется демографическими показателями повышения относительного количества пожилых людей в развитых странах. Причем благосостояние, рациональное питание и здоровый образ жизни личности не являются профилактикой этих заболеваний, о чем свидетельствуют примеры таких известных политических деятелей как Рональд Рейган и Маргарет Тэтчер. Неутешительные статистические данные свидетельствуют о том, что в настоящее время болезнью Альцгеймера страдает несколько миллионов человек, что влечет за собой значительные затраты на лечение [2, 3]. Оценки и прогнозы соответствующих медицинских организаций показывают [4], что нахождение эффективных способов борьбы с болезнью Альцгеймера к 2025 году позволит только в США сэкономить на здравоохранение до 220 миллиардов долларов в год. В связи с этим на решение данной проблемы брошены значительные научные силы и ресурсы – издается более десятка специализированных журналов, например, *Journal of Alzheimer's Disease* [5], работает международное научное общество «Alzheimer's Association» [6], регулярно проводятся научные конференции. Количество цитирований некоторых основополагающих работ по этой проблеме, например [7], достигает нескольких тысяч.

Для выбора стратегии борьбы с нейродегенеративными заболеваниями в рамках различных биологических и медицинских дисциплин ведется поиск причин и факторов, вызывающих нарушения, на уровне организма в целом, клеток и отдельных биомолекул, поскольку для создания соответствующих лекарственных средств необходимо определить мишени для их действия в организме. В задачи молекулярной биофизики входит установление молекулярных механизмов взаимодействия лекарственных препаратов с их молекулярными мишенями.

Поскольку изучению биомолекулярных процессов, сопровождающих болезнь Альцгеймера [7], и разработке соответствующих фармакологических препаратов посвящено множество публикаций, часть из которых все еще носит дискуссионный характер, мы отметим лишь те статьи, на основе которых была выбрана молекулярно-биофизическая задача для данного исследования.

Среди выявленных к настоящему времени возможных причин возникновения и развития болезни Альцгеймера является повреждение нервных клеток или волокон за счет нарушения структуры и функционирования двух видов белков: бета-амилоидного пептида А β и Тау-белка (tau protein) [8, 9]. Поскольку в последнее время сформировалось мнение, что предложенные препараты, мишенью которых являются бета-амилоиды, не проявили ожидавшуюся от них эффективность [8, 9], внимание исследователей переключилось на Тау-белки как более уязвимую терапевтическую мишень [10-16].

Тау-белок принадлежит к группе белков, ассоциированных с микротрубочками нейронов (microtubule-associated protein tau, МАРТ) [17-19]. Нарушения, связанные с Тау-белками, называют таупатиями. При болезни Альцгеймера и некоторых других избыточно фосфорилированные (гиперфосфорилированные) Тау-белки теряют связь с белками тубулинами на поверхности микротрубочек, чем нарушают стабилизацию их структуры. Высвободившиеся молекулы Тау-белков начинают ассоциировать друг с другом, образуя ряд агрегационных форм: свернутые токсичные олигомерные формы, плотно упакованные парные спиральные филаменты (нити) (paired helical filaments) и, далее, нерастворимые нейрофибриллярные клубки (neurofibrillary tangles, NFTs). Последние, накапливаясь внутриклеточно, нарушают нормальное функционирование пораженных нейронов, что в конечном итоге, приводит к дегенерации и гибели нервных клеток.

Соответственно, искомые лекарственные вещества должны определенным образом воздействовать на агрегацию Тау-белков – либо предотвращать ее, либо разрушать агрегаты (tau aggregation inhibitors, ТАИ). [10, 13, 15, 20, 21]. (Альтернативный подход ингибирования одной или нескольких протеинкиназ, фосфорилирующих Тау-белок [16], не относится к теме данного исследования).

Установлено, что Тау-белок стабилизирует микротрубочки, связываясь с ними через четыре так называемых тубулин-связывающих домена R1-R4 [19]; эти же домены Тау-белков задействованы в их агрегации в парные филаменты (олигомерные формы) [22]. Блокировка этих доменов должна препятствовать агрегации. Было высказано предположение [23-25], что находящиеся в этих доменах два редокс-активных аминокислотных остатка цистеина (C291, C322) являются подходящей мишенью для модификации. Не так давно появились сообщения [26] об экспериментальном подтверждении этой гипотезы.

Среди низкомолекулярных соединений, способных воздействовать на Тау-белки [9, 26-28], испытывается катионный краситель метиленовый синий (Methylene Blue, МВ, называемый также methylthioninium, МТ, и methylthioninium chloride, МТС) [29-31], который, благодаря своим оптическим и редокс-свойствам, находит широкое применение в различных областях фармакологии, биомедицины и нанотехнологии [32, 33]. Также проверяется эффективность производных МВ – его лейкоформы (leuco MB, LMB) [34-36] и азуров [26].

Ряд зарубежных фирм, в частности TauRx Therapeutics [37] проводят испытания (во второй и третьей фазах) препаратов на основе МВ [11] (под названием Rember[®]) и его лейкоформы (LMTX[®], "TRx0237") [34].

Что касается установления молекулярных механизмов действия метиленового синего и родственных ему соединений на Тау-белки то, несмотря на наличие ряда работ по этой теме [9, 21, 24-27], полученные в них данные противоречивы и обсуждение носит в основном спекулятивный характер на уровне обсуждения возможных путей взаимодействия. Так, рассматриваются возможности невалентных и ковалентных взаимодействий [14]. Невалентные взаимодействия заключаются во встраивании малых молекул между формирующимися олигомерами Тау-белков, что должно препятствовать их дальнейшей агрегации в нерастворимые нейрофибриллярные клубки. Ковалентные взаимодействия состоят в редокс-реакциях молекул препаратов с определенной выше мишенью – двумя остатками цистеина в тубулин-связывающих доменах Тау-белков. При этом возможны два варианта модификации цистеина: это либо блокировка каждого из остатков путем окисления, либо окислительная реакция с образованием внутри- или межмолекулярной сшивки – дисульфидного мостика. Исследование таких процессов с помощью масс-спектрометрических методик к настоящему времени не проводилось, за исключением одного сообщения [26], результаты которого не вызывают доверия по следующей причине. Авторы работы [26] проводили поиск продуктов окисления отдельных молекул цистеина (R-SH), которые, как предполагалось, должны представлять собой кислородсодержащие производные вида R-SOH, R-SOON, R-SO₂OH, с использованием метода масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением растворов (электроспрей); однако в приводимом в статье масс-спектре не содержались молекулярные ионы перечисленных соединений, а заключения делались на основе косвенных данных.

Среди экспериментальных методов молекулярно-биологических и биофизических исследований в последнее время разработаны мягкоионизационные масс-спектрометрические методики для изучения механизмов действия биологически активных веществ и фармакологических препаратов на модельном молекулярном уровне [38-40]. Благодаря развитию и совершенствованию масс-спектрометрических методик, значительный прогресс достигнут в такой сравнительно новой области науки как протеомика [41]. В связи с превалированием в недавнем прошлом интереса к бета-амилоидной модели нейродегенеративных процессов, большинство протеомных масс-спектрометрических исследований в этой области были направлены на изучение именно бета амилоидов [42-49]; тау-белкам уделялось меньше внимания [50, 51]. На уровне малых молекул активно разрабатывались масс-спектрометрические подходы к изучению окислительно-восстановительных свойств редокс-активных веществ [52-54], в частности редокс-активных красителей [55, 56] и метиленового синего в их числе [57, 58]. При использовании методов вторично-ионной масс-спектрометрии (ВИМС), бомбардировки быстрыми атомами (ББА), матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) нами установлены особенности редокс-превращений метиленового синего в зависимости от метода воздействия и окружающей среды [59-65].

Из всего вышесказанного следует, что молекулярный механизм действия метиленового синего до сих пор не установлен, в основном, по причине сложности многокомпонентной системы и неоднозначности путей взаимодействия. В связи с этим представляется логичным начать поиск с модельной системы на мономерном уровне и с использованием масс-спектрометрического метода, позволяющего однозначно идентифицировать компоненты смесей. Таким образом, целью данной работы явилось установление результатов редокс-взаимодействия метиленового синего с аминокислотой цистеином как одного из предполагаемых молекулярных механизмов его фармакотерапевтического действия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе использовали препараты метиленового синего производства ОАО «Витамины» (Умань, Украина) и аминокислоты цистеина производства «Реахим», (Российская Федерация).

Для приготовления растворов использовали деионизированную воду и пластиковую посуду.

В качестве жидкой матрицы для БА исследований использовали глицерин (Sigma, Германия).

Редокс-взаимодействие метиленового синего с цистеином

Для получения концентрационных и временных зависимостей редокс-реакций между метиленовым синим и цистеином готовили водные растворы компонентов с разными концентрационными соотношениями и выдерживали в течение суток с периодическим контролем состояния системы. Для масс-спектрометрических исследований готовили образцы, содержащие однопроцентный раствор ($3,2 \cdot 10^{-2}$ М) метиленового синего и цистеин в ряду концентраций $88 \cdot 10^{-2}$ М, $44 \cdot 10^{-2}$ М и $22 \cdot 10^{-2}$ М. В связи с использованием в спектрофотометрических исследованиях растворов с более низкой, чем для масс-спектрометрии, общей концентрацией веществ, готовили также систему с $1,1 \cdot 10^{-4}$ М метиленового синего и $90 \cdot 10^{-4}$ М цистеина. Осуществление реакции наблюдали визуально по постепенному обесцвечиванию раствора и контролировали инструментально методом спектрофотометрии.

Оптическая спектроскопия

Спектры поглощения в УФ и видимом диапазоне получали на двухлучевом спектрофотометре Hitachi 356 (Япония), в кварцевой кювете 10 мм, при спектральной ширине щели 2 нм. Для получения временных зависимостей спектры водного раствора смеси метиленового синего ($1,1 \cdot 10^{-4}$ М) и цистеина ($9 \cdot 10^{-3}$ М) записывали с интервалами от десятков минут до нескольких часов.

Масс-спектрометрия

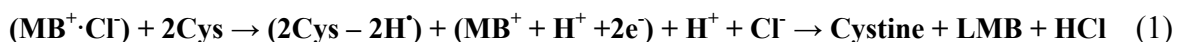
Масс-спектры с БА в режиме положительных ионов регистрировали с помощью секторного магнитного масс-спектрометра МИ-1201Э (НПО «SELMi», Сумы, Украина). В качестве бомбардирующего газа использовали аргон; энергия первичного пучка составляла 4,0 кэВ. В качестве жидкой матрицы для исследуемых веществ использовали глицерин. Переход в режим ВИМС путем отключения опции нейтрализации пучка ионов аргона не приводил к качественным изменениям получаемых масс-спектров.

При пробоподготовке равные объемные части глицериновой матрицы и обесцвеченных водных растворов метиленового синего и цистеина с различными концентрационными соотношениями смешивали для того, чтобы в исследуемом образце сохранялись указанные исходные концентрации красителя и аминокислоты после испарения воды из образца в форвакуумной системе масс-спектрометра. Альтернативно, бесцветные кристаллы, осажденные из реакционной смеси, перерастворяли в глицериновой матрице. Каплю образца объемом 5 мкл наносили на стандартную алюминиевую подложку. БА масс-спектры записывали в течение первых 5-10 минут после начала бомбардировки. При извлечении образца из вакуумной камеры по окончании эксперимента капля раствора оставалась бесцветной, что свидетельствовало об отсутствии реакций в объеме образца в данных экспериментальных условиях. В контрольных БА/ВИМС масс-спектрах образцов чистого цистеина наблюдался интенсивный пик протонированной аминокислоты; пики в массовой области ожидаемого продукта редокс-реакции (240-245 а.е.м.) находились на уровне фона.

Обработку БАА масс-спектров редокс-активных соединений проводили в соответствии с разработанными нами ранее подходами [59-61, 64, 65].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Окислительно-восстановительная реакция цистеина с органической солью метиленовым синим ($\text{MB}^+\cdot\text{Cl}^-$) как окислителем, приводящая к шивке двух молекул цистеина (Cys) в цистин посредством образования дисульфидного мостика, а также лейкоформы LMB, имеет следующий вид:



О прохождении такой реакции в системе (цистеин – метиленовый синий) свидетельствует обесцвечивание водного раствора вследствие перехода метиленового синего в бесцветную лейкоформу [66]. Концентрационные и временные параметры взаимодействия показывают, что уменьшение интенсивности окрашивания системы проходит более активно с увеличением концентрации цистеина и прогрессирует во времени. Наблюдаемые визуально изменения количественно измерялись методом спектроскопии поглощения в видимом и УФ диапазонах (Рис. 1).

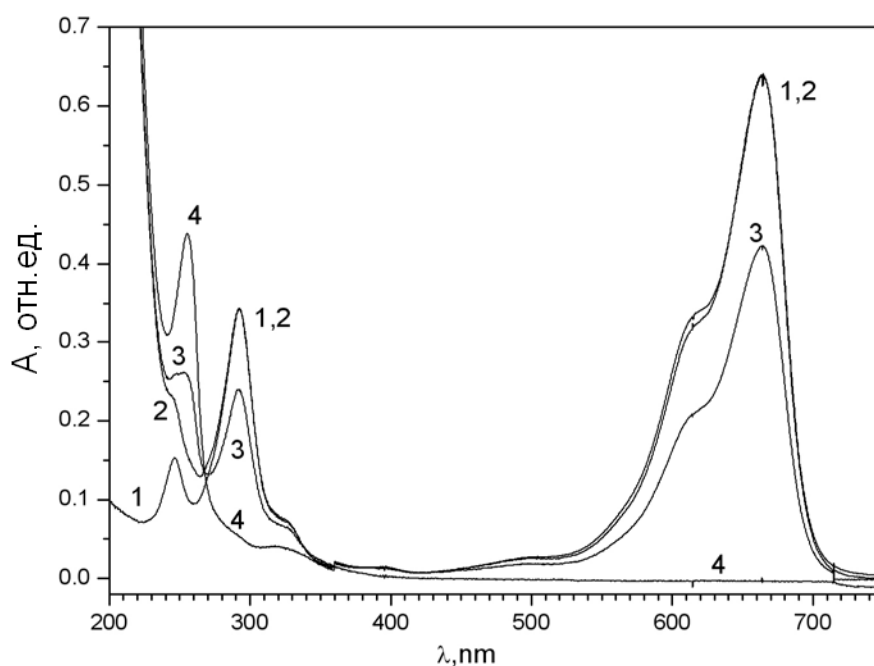


Рис. 1. Изменения спектров поглощения в зависимости от времени взаимодействия в смеси (метиленовый синий - цистеин). Линия 1 - спектр водного раствора контрольного образца метиленового синего, $C_{\text{MB}}=1,1 \cdot 10^{-4}$ М. Линии 2-4 - спектры того же раствора после добавления к нему $9 \cdot 10^{-3}$ М цистеина, зарегистрированные через 10 мин (2), через 4 часа (3) и через 20 часов (4). Характеристичные значения максимумов полос поглощения для чистого метиленового синего – $\lambda = 663$ нм, 614 нм, 292 нм; для лейкоформы метиленового синего – $\lambda = 256$ нм. Положение изобестической точки – $267,5 \pm 1$ нм.

В спектре контрольного образца водного раствора $1,1 \cdot 10^{-4}$ М метиленового синего (линия 1) зарегистрированные значения максимумов поглощения в видимом ($\lambda = 663$ нм) и УФ ($\lambda = 292$ нм) диапазонах соответствуют литературным данным [67-70]. В спектре системы (цистеин – метиленовый синий) (линия 2) в УФ области добавляется широкая полоса, в которой перекрываются полосы поглощения цистеина

[71] и цистина [71], что препятствует использованию данного параметра для наблюдения за динамикой образования цистина как продукта реакции (1). С увеличением времени (линии 3, 4) интенсивности полос поглощения метиленового синего уменьшаются вплоть до исчезновения (линия 4); при этом заметно возрастает полоса с $\lambda = 256$ нм, соответствующая лейкоформе метиленового синего [69]. Отметим, что в области длины волны $\lambda = 256$ нм происходит перекрытия полос, характерных для обоих продуктов реакции – цистина и лейкоформы метиленового синего – однако появление четко выраженного пика с максимумом на $\lambda = 256$ нм характерно именно для лейкоформы. Примечательно, что в наборе спектров (2-4) присутствует изобестическая точка $\lambda = 267,5 \pm 1$ нм, свидетельствующая о наличии в реакционной системе только двух превращающихся друг в друга компонентов (MB^+ и LMB), что подтверждается также отсутствием полосы с $\lambda = 420$ нм для возможного промежуточного продукта – полувосстановленной радикальной формы MB^{\cdot} [69].

Идентификацию продуктов взаимодействия в системе (цистеин – метиленовый синий) проводили с помощью ББА масс-спектрометрии. В ББА масс-спектре (Рис. 2) присутствуют пик, соответствующий исходному компоненту системы – цистеину – в протонированной форме $Cys \cdot H^+$, m/z 122, и сигналы глицериновой матрицы. Основным результатом является регистрация продукта окисления цистеина – цистина – в протонированной форме $[2Cys - 2H^+] \cdot H^+$, m/z 241. Отметим, что сигнал нековалентного димера цистеина $2Cys \cdot H^+$, m/z 243 отсутствует, то есть возможные невалентные взаимодействия в данном случае не реализуются. В масс-спектре отсутствуют какие-либо сигналы, которые можно было бы интерпретировать как продукты окисления мономеров цистеина посредством присоединения от одного до трех атомов кислорода, возможность образования которых обсуждалась в работе [26].

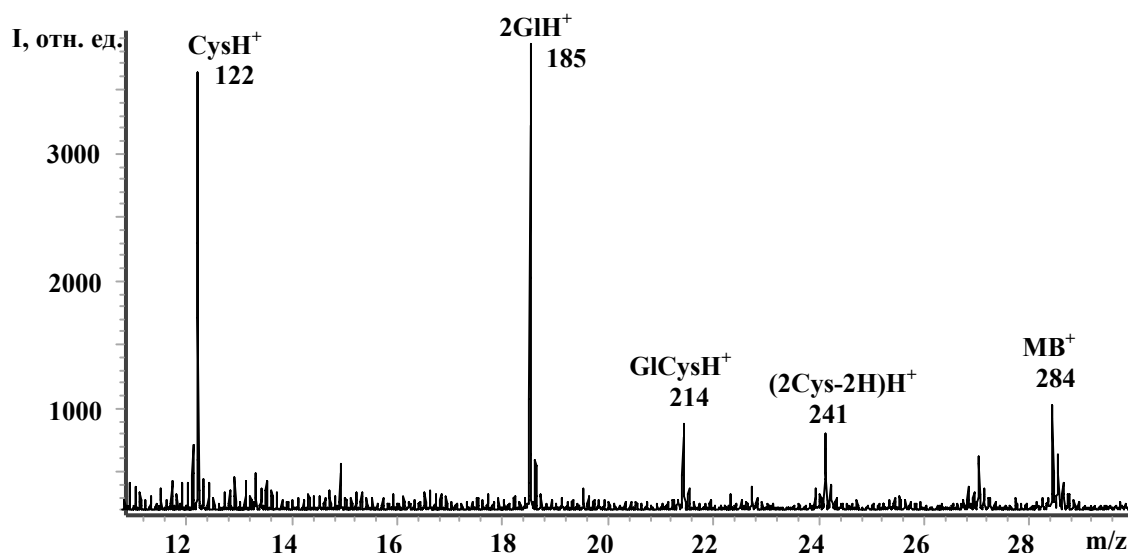


Рис. 2. ББА масс-спектр системы (цистеин – метиленовый синий). Образец – бесцветные кристаллы, осажденные из водного раствора смеси $3,2 \cdot 10^{-2}$ М метиленового синего и $4,4 \cdot 10^{-1}$ М цистеина, выдержанного 10 часов, растворены в глицериновой (Gl) матрице.

В области пакета пиков метиленового синего и его лейкоформы наиболее интенсивными являются пики с m/z 284 и 285; пик протонированной лейкоформы отсутствует. Поскольку образец, извлеченный из прибора по окончании эксперимента,

сохранял бесцветное окрашивание и в условиях вакуума отсутствовал окислитель – кислород, можно заключить, что названный набор пиков соответствует лейкоформе метиленового синего; возможный механизм формирования таких ионов обсуждался ранее [72] и выходит за рамки данного сообщения.

Соотношение абсолютных интенсивностей пиков в области цистина и метиленового синего на Рис. 2 указывает на соответствие количеств окисленного цистеина и восстановленного метиленового синего согласно реакции (1). Масс-спектры, полученные для систем с другими соотношениями компонентов, указывают на то, что протекание реакции требует избытка цистеина; при понижении относительной концентрации цистеина интенсивность пика, соответствующего цистину, понижается. Для разных соотношений концентраций как сразу после обесцвечивания, так и для простоявших несколько суток обесцвеченных растворов, не регистрируется с течением времени каких-либо изменений в масс-спектре. Задача данной работы состояла в установлении продуктов редокс-реакций цистеина и метиленового синего; поиск путей повышения эффективности взаимодействия и установление влияния физиологических условий требует дальнейших исследований.

Полученный результат относительно образования дисульфидных мостиков можно использовать для объяснения установленной эффективности препаратов на основе метиленового синего на ранних стадиях развития болезни Альцгеймера [11, 30]. Образование внутримолекулярных сшивок остатков цистеина в адсорбционно-активных R1-R4 участках тау-белков должно ингибировать агрегацию индивидуальных молекул тау-белков на стадии их отделения от микротрубочек нейронов. Образование межмолекулярных дисульфидных мостиков между мономерами тау-белков запускает механизм, описанный в проекте [73]: контакты поверхности двух молекул белков, связавшихся дисульфидным мостиком, при тепловом движении молекул могут приводить к нарушению их вторичной и третичной структуры – фактически разворачиванию, что делает белки в «неправильной» конформации уязвимыми для ферментов-протеаз. Протеазы разрезают полипептидную цепь на фрагменты, которые могут выводиться из клетки. Отметим, что стратегия создания дисульфидных мостиков между молекулами определенных белков используется при разработке специфических препаратов против некоторых других, в частности онкологических, заболеваний и микробных инфекций [74].

Результаты для использованной модельной системы не дают информации относительно возможности нековалентных взаимодействий метиленового синего с тау-белками в образующихся на более поздних стадиях болезни Альцгеймера нейрофибриллярных клубках, инициирующих разделение белков. Пониженная эффективность метиленового синего на такой стадии указывает на малый вклад этого механизма. В то же время возможность разделения белков в клубках ожидается от препаратов на основе лейкоформы метиленового синего [34]. Показанное в эксперименте образование бесцветной лейкоформы при взаимодействии катионного метиленового синего с цистеином дает основания для предположения о возможном дальнейшем участии лейкоформы во взаимодействиях со специфичными для нее мишенями. То есть, в принципе, в определенных условиях исходный метиленовый синий может действовать как два препарата в катионной и нейтральной форме. Лейкоформа может образовываться также при взаимодействии метиленового синего с другими серусодержащими молекулами в организме. В связи с этим возникает вопрос о причинах наблюдающейся более высокой эффективности препаратов на основе лейкоформы [37], который требует дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

На основе данных масс-спектрометрического и спектрофотометрического исследования модельной системы (аминокислота цистеин - метиленовый синий) установлен возможный молекулярный механизм действия редокс-активного агента метиленового синего при его взаимодействии с тау-белками, рассматриваемыми в качестве молекулярной мишени при терапии нейродегенеративных заболеваний.

1. Показано, что окисляющее воздействие редокс-активного красителя метиленового синего на аминокислоту цистеин состоит в образовании дисульфидного мостика между двумя молекулами цистеина, т. е. сшивки их в цистин.

2. Окисленные путем присоединения кислорода мономеры цистеина, возможность образования которых обсуждалась в литературе, не обнаружены.

3. Показанное на мономерном уровне образование дисульфидных мостиков между молекулами цистеина под воздействием метиленового синего, при его осуществлении на биополимерном уровне, может способствовать реализации ожидаемого от редокс-активного агента эффекта – препятствования агрегации тау-белков.

4. В ходе редокс-реакции метиленовый синий переходит в свою лейкоформу, которая также позиционируется в литературе перспективным лекарственным агентом.

Полученные результаты, позволившие установить сам факт протекания редокс-реакции между цистеином и метиленовым синим, а также идентифицировать продукт взаимодействия, представляют практический интерес для дальнейшего целенаправленного поиска лекарственных средств для лечения или торможения нейродегенеративных заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alzheimer: 100 Years and Beyond / M. Jucker, K. Beyreuther, C. Haass, R. Nitsch, Y. Christen (Eds.) – Berlin: Springer, 2006. – 543 p.
2. Alzheimer disease research in the 21st century: past and current failures, new perspectives and funding priorities / F. Pistollato, E.L. Ohayon, A. Lam [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – V. 7, N 26. – P. 38999–39016.
3. 2017 Alzheimer's disease facts and figures (Alzheimer's Association Report) // *Alzheimer's & Dementia*. – 2017. – V. 13, N 4. – P. 325–373.
4. Changing the trajectory of Alzheimer's disease: How a treatment by 2025 saves lives and dollars (Alzheimer's Association Report) – Mode of access: WWW.URL: http://alz.org/documents_custom/ALZ_Trajectory2015_FINAL_01.27.15.pdf – Last access: May 26, 2017. – Title from the screen.
5. The Journal of Alzheimer's Disease - Mode of access: WWW.URL: <http://www.j-alz.com/> – Last access: May 26, 2017. – Title from the screen.
6. Site: Alzheimer's Association – Mode of access: WWW.URL: <http://www.alz.org/> – Last access: May 26, 2017. – Title from the screen.
7. Selkoe D.J. The molecular pathology of Alzheimer's disease / D.J. Selkoe // *Neuron*. – 1991. – V. 6, N 4. – P. 487–498.
8. Татарникова О.Г. Бета-амилоид и Тау-белок: структура, взаимодействие и прионоподобные свойства / О.Г. Татарникова, М.А. Орлов, Н.В. Бобкова // *Усп. биол. хим.* – 2015. – Т. 55. – С. 351–390. / Tatarnikova O.G. Beta-amyloid I Tau-belok: struktura, vzaimodeistvie i prionopodobnye svojstva / O.G. Tatarnikova, M.A. Orlov, N.V. Bobkova // *Usp. biol. khim.* – 2015. – Т. 55. – С. 351–390.
9. Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies / G. Šimić, M. Babić Leko, S. Wray [et al.] // *Biomolecules*. – 2016. – V. 6, N 1. – Article ID 6, 28 p.
10. Wischik C.M. Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease / C.M. Wischik, C.R. Harrington, J.M.D. Storey // *Biochem. Pharmacol.* – 2014. – V. 88, N 4. – P. 529–539.
11. Tau aggregation inhibitor therapy: An exploratory phase 2 study in mild or moderate Alzheimer's disease / C.M. Wischik, R.T. Staff, D.J. Wischik [et al.] // *J. Alzheimer's Dis.* – 2015. – V. 44, N 2. – P. 705–720.
12. Tau-centric targets and drugs in clinical development for the treatment of Alzheimer's disease / F. Panza, V. Solfrizzi, D. Seripa [et al.] // *BioMed Res. Int.* – 2016. – V. 2016. – Article ID 3245935, 15 p.
13. Tau aggregation inhibitors: the future of Alzheimer's pharmacotherapy? / F. Panza, D. Seripa, V. Solfrizzi [et al.] // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2016. – V. 17, N 4. – P. 457–461.

14. Guzmán-Martinez L. Tau oligomers as potential targets for Alzheimer's diagnosis and novel drugs / L. Guzmán-Martinez, G.A. Farias, R.B. Maccioni // *Front. Neurol.* – 2013. – V. 4. – Article ID 167, 6 p.
15. Takashima A. Tau aggregation is a therapeutic target for Alzheimer's disease / A. Takashima // *Curr. Alzheimer Res.* – 2010. – V. 7, N 8. – P. 665–669.
16. Badiola N. Tau phosphorylation and aggregation as a therapeutic target in tauopathies / N. Badiola, M. Suárez-Calvet, A. Lleó // *CNS Neurol. Disord.: Drug Targets.* – 2010. – V. 9, N 6. – P. 727–740.
17. *Tau Protein. Methods and Protocols* / C. Smet-Nocca (Ed.) – New York: Humana Press, 2017. – 432 p.
18. Bakota L. Tau biology and Tau-directed therapies for Alzheimer's disease / L. Bakota, R. Brandt // *Drugs.* – 2016. – V. 76, N 3. – P. 301–313.
- 19 The many faces of tau / M. Morris, S. Maeda, K. Vossel, L. Mucke // *Neuron.* – 2011. – V. 70, N 3. – P. 410–426.
20. Development of tau aggregation inhibitors for Alzheimer's disease / B. Bulic, M. Pickhardt, B. Schmidt [et al.] // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 2009. – V.48, N 10. – P. 1740–1752.
21. Structure and mechanism of action of tau aggregation inhibitors / K. Cisek, G.L. Cooper, C.J. Huseby, J. Kuret // *Curr. Alzheimer Res.* – 2014. – V. 11, N 10. – P. 918–927.
22. Sites of tau important for aggregation populate β -structure and bind to microtubules and polyanions / M.D. Mukrasch, J. Biernat, M. von Bergen [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280, N 26. – P. 24978–24986.
23. Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments / Schweers O., Mandelkow E.M., Biernat J., Mandelkow E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1995. – V. 92, N 18. – P. 8463–8467.
24. Aminothienopyridazines and methylene blue affect Tau fibrillization via cysteine oxidation / A. Crowe, M.J. James, V.M.-Y. Lee [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – V. 288, N 16. – P. 11024–11037.
25. Methylene blue inhibits caspases by oxidation of the catalytic cysteine / P. Pakavathkumar, G. Sharma, V. Kaushal [et al.] // *Sci. Rep.* – 2015. – V. 5, N 1. – Article ID 13730, 13 p.
26. Mechanistic basis of phenothiazine-driven inhibition of tau aggregation / E. Akoury, M. Pickhardt, M. Gajda [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2013. – V. 52, N 12. – P. 3511–3515.
27. Structure and mechanism of action of tau aggregation inhibitors / K. Cisek, G.L. Cooper, C.J. Huseby, J. Kuret // *Curr. Alzheimer Res.* – 2014. – V. 11, N 10. – P. 918–927.
28. Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines / C.M. Wischik, P.C. Edwards, R.Y. Lai [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1996. – V. 93, N 20. – P. 11213–11218.
29. Oz M. Methylene blue and Alzheimer's disease / M. Oz, D.E. Lorke, G.A. Petroianu // *Biochem. Pharmacol.* – 2009. – V. 78, N 8. – P. 927–932.
30. Preventive methylene blue treatment preserves cognition in mice expressing full-length pro-aggregant human Tau / K. Hochgräfe, A. Sydow, D. Matenia [et al.] // *Acta Neuropathol. Commun.* – 2015. – V. 3. – Article ID 25, 22 p.
31. Preparation and characterization of methylene blue nanoparticles for Alzheimer's disease and other tauopathies / U.K. Jinwal, A. Groshev, J. Zhang [et al.] // *Curr. Drug Delivery* – 2014. – V. 11, N 4. – P. 541–550.
32. Lest we forget you - methylene blue... / R.H. Schirmer, H. Adler, M. Pickhardt, E. Mandelkow [et al.] // *Neurobiol. Aging.* – 2011. – V. 32, N 12. – P. 2325.e7–2325.e16.
33. Шелковский В.С. Использование окислительно-восстановительных и агрегационных свойств красителя метиленового синего в нанобиофизических исследованиях / В.С. Шелковский // *Біофізичний Вісник.* – 2015. – Т. 33, № 1. – С. 5–29. / Shelkovskiy V.S. Ispol'zovanie oksilitelno-vosstanovitelnyh svojstv krasitelya metilenovogo sinego v nanobiofizicheskikh issledovaniyah / V.S. Shelkovskiy // *Biofizychnyj Visnyk.* – 2015. – Т. 33, N 1. – С. 5–29.
34. Complex disposition of methylthioninium redox forms determines efficacy in tau aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease / T.C. Baddeley, J. McCaffrey, J.M. Storey [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2015. – V. 352, N 1. – P.110–118.
35. Tau-directed approaches for the treatment of Alzheimer's disease: focus on leuco-methylthioninium / D. Seripa, V. Solfrizzi, B.P. Imbimbo [et al.] // *Expert Rev. Neurother.* – 2016. – V. 16, N 3. – P. 259–277.
36. Effects of oxidized and reduced forms of methylthioninium in two transgenic mouse tauopathy models / Melis V., Magbagbeolu M., Rickard J.E. [et al.] // *Behav. Pharmacol.* – 2015. – V. 26, N 4. – P. 353–368.
37. Site: TauRx Therapeutics. Innovation in neurodegeneration – Mode of access: WWW.URL: <http://taurx.com/science/> – Last access: May 26, 2017. – Title from the screen.
38. a) Kaltashov I.A. Mass spectrometry in biophysics: conformation and dynamics of biomolecules / I.A. Kaltashov, S.J. Eyles. – Hoboken: John Wiley, 2005. – 458 p.
b) Kaltashov I.A. Mass spectrometry in structural biology and biophysics: architecture, dynamics, and interaction of biomolecules / I.A. Kaltashov, S.J. Eyles, 2nd edition – Hoboken: John Wiley, 2012. – 289 p.

39. Mechanistic investigation of the interaction between bisquaternary antimicrobial agents and phospholipids by liquid secondary ion mass spectrometry and differential scanning calorimetry / V.A. Pashynskaya, M.V. Kosevich, A. Gomory [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2002. – V. 16, N 18. – P. 1706–1713.
40. Characterization of noncovalent complexes of antimalarial agents of the artemisinin-type and Fe(III)-heme by electrospray mass spectrometry and collisional activation tandem mass spectrometry / V.A. Pashynska, H. Van den Heuvel, M. Claeys, M.V. Kosevich M.V. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2004. – V. 15, N. 8. – P. 1181–1190.
41. Лебедев А.Т. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов / А.Т. Лебедев, К.А. Артеменко, Т.Ю. Самгина. – М.: Техносфера, 2012. – 176 с. / Lebedev A.T. Osnovy mass-spektrometrii belkov i peptidov / A.T. Lebedev, K.A. Artemenko, T.Yu. Samgina. – М.: Tekhnosfera, 2012. - 176 s.
42. Quantification of the brain proteome in Alzheimer's disease using multiplexed mass spectrometry / S. Musunuri, M. Wetterhall, M. Ingelsson [et al.] // *J. Proteome Res.* – 2014. – V. 13, N 4. – P. 2056–2068.
43. Liu Ya. Biomarkers in Alzheimer's disease analysis by mass spectrometry-based proteomics / Ya. Liu, H. Qing, Yu. Deng // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – V. 15, N 5. – P. 7865–7882.
44. Gu L. Sample multiplexing with cysteine-selective approaches: cysDML and cPILOT / L. Gu, A.R. Evans, R.A.S. Robinson // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2015. – V. 26, N 4. – P. 615–630.
45. Molecular mapping of Alzheimer's disease: Imaging mass spectrometry / G. Perry, A.R. Kelley, S. Bach, R.J. Castellani // *Alzheimer's Dementia.* – 2015. – V. 11, N 7. – P. 545.
46. Imaging mass spectrometry for the research of Alzheimer's disease / M. Ikegawa, T. Miyasaka, N. Kakuda, Ya. Ihara // *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* – 2016. – V. 64, N 1. – P. 17–20.
47. Differential mass spectrometry profiles of tau protein in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease, progressive supranuclear palsy, and dementia with Lewy bodies / N.R. Barthélemy, A. Gabelle, C. Hirtz [et al.] // *J. Alzheimer's Dis.* – 2016. – V. 51, N 4. – P. 1033–1043.
48. Identification of potential modifiers of Alzheimer's disease pathology by quantitative mass spectrometry and drosophila genetics / B.D. Minjarez, M.L. Valero, K.G. Calderon-Gonzalez [et al.] // *Alzheimer's Dementia.* – 2015. – V. 11, N 7. – P. P512–P513.
49. Estimation of phosphorylation level of amyloid-beta isolated from human blood plasma: ultrahigh-resolution mass spectrometry / I.A. Popov, M.I. Indeikina, S.I. Pekov [et al.] // *Mol. Biol. (Moscow).* – 2014. – V. 48, N 4. – P. 607–614.
50. Becker J.S. Studies of structure and phosphorylation of tau protein using high resolution mass spectrometry / J.S. Becker, M. Przybylski // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2007. – V.22., N7. - P. 761-765.
51. Difficulties associated with the structural analysis of proteins susceptible to form aggregates: The case of Tau protein as a biomarker of Alzheimer's disease / L. Hromadkova, R. Kupcik, B. Jankovicova [et al.] // *J. Sep. Science.* – 2016. – V. 39, N4. – P. 799–807.
52. Vekey K. Chemical reactions in fast atom bombardment mass spectrometry / K. Vekey, L.F. Zerilli // *Org. Mass Spectrom.* – 1991. – V. 26, N 11. – P. 939–944.
53. Pelzer G. Oxidation-reduction processes occurring in secondary ion mass spectrometry and fast atom bombardment of glycerol solutions / G. Pelzer, E. D. Pauw, J. Marien // *J. Phys. Chem.* – 1984. – V. 88, N 21. – P. 5065–5068.
54. Ohashi Y. Unprecedented matrix-induced reduction of flavins observed under FAB and MALDI conditions / Y. Ohashi, Y. Itoh // *Curr. Org. Chem.* – 2003. – V. 7, N 15. – P. 1605–1611.
55. Reduction of organic dyes in matrix-assisted laser desorption/ionization and desorption/ ionization on porous silicon / S. Okuno, M. Nakano, G.E. Matsubayashi // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2004. – V. 18, N 23. – P. 2811–2817.
56. Asakawa D. Study on the redox reactions for organic dyes and S-nitrosylated peptide in electrospray droplet impact / D. Asakawa, K. Hiraoka // *J. Mass Spectrom.* – 2009. – V. 44, N 4. – P. 461–465.
57. Reduction of methylene blue during the ionization process / D.J. Burinsky, R.L. Dilliplane, G.C. DiDonato, K.L. Busch // *Org. Mass Spectrom.* – 1988. – V. 23, N 4. – P. 231–235.
58. Kazakoff C.W. Reduction processes in fast atom bombardment mass spectrometry: Methylene blue in glycerol-thioglycerol and glycerol-nitrobenzyl alcohol matrices / C.W. Kazakoff, R.T.B. Rye // *Org. Mass Spectrom.* – 1991. – V. 26, N 3. – P. 154–156.
59. Kosevich M.V. Boryak O.A., Chagovets V.V., Shelkovsky V.S., Pokrovskiy V.A. Interactions of biologically active redox-sensitive dyes with nanomaterials: mass spectrometric diagnostics // *Nanobiphsysics: Fundamen-tal and Applications* / Ed. V.A. Karachevtsev. – Singapore: Pan Stanford Publishing. 2015. – P. 179–216.
60. Evaluation of the reduction of imidazophenazine dye derivatives under fast atom bombardment mass spectrometric conditions / M.V. Kosevich, O.A. Boryak, V.V. Orlov [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2006. – V. 41, N 1. – P. 113–123.

61. Sensitivity of redox reactions of dyes to variations of conditions created in mass spectrometric experiments / M.V. Kosevich, V.V. Chagovets, I.V. Shmigol [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2008. – V. 43, N 10. – P. 1402–1412.
62. Масс-спектрометрия с лазерной десорбцией/ионизацией красителя метиленового голубого с поверхности мезопористых тонких пленок TiO₂, SiO₂/TiO₂ и SiO₂ / Т.В. Фесенко, М.В. Косевич, Н.И. Суровцева и др. // *Масс-спектрометрия.* - 2007. - Т. 4, N 4. – С. 289–296. / *Mass-spektrometriya s lazernoj desorbciej/ionizaciej krasitelya metilenovogo golubogo s poverhnosti mezoporistyh tonkih plenok TiO₂, SiO₂/TiO₂ i SiO₂ / T.V. Fesenko, M.V. Kosevich, N.I. Surovtseva i dr. // Mass-Spektrometria.* – 2007. – Т. 4, N 4. – С. 289–296.
63. Chemically modified porous silicon for laser desorption/ionization mass spectrometry of ionic dyes / I.V. Shmigol, S.A. Alekseev, O.Yu. Lavrynenko [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2009. – V. 44, № 8. – P. 1234–1240.
64. Noncovalent interaction of methylene blue with carbon nanotubes: theoretical and mass spectrometry characterization / V.V. Chagovets, M.V. Kosevich, S.G. Stepanian [et al.] // *J. Phys. Chem. C.* – 2012. – V. 116, N 38. – P. 20579–20590.
65. Monomer/dimer dependent modulation of reduction of the cationic dye methylene blue in negatively charged nanolayers as revealed by mass spectrometry / V.S. Shelkovsky, M.V. Kosevich, O.A. Boryak [et al.] // *RSC Advances.* – 2014. – V. 4, N 104. – P. 60260–60269.
66. Теренин А.Н. Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений. – Л.: Наука, 1967. – 616 с. / Terenin A.N. Fotonika molekul krasitelej i rodstvennyh organicheskikh soedinenij. – L.: Nauka, 1967. – 616 s.
67. Optical absorption of methylene blue. [Electronic resource] // Oregon Medical Lazer Center, OMLC web site - Mode of access: <http://omlc.org/spectra/mb/>. – Last access: May 26, 2017. – Title from the screen.
68. Cenens J. Visible spectroscopy of methylene blue on hectorite, laponite B, and barasym in aqueous suspension / J. Cenens, R.A. Schoonheydt // *Clays. Clay Miner.* – 1988. – V. 36, N 3. – P. 214–224.
69. Kinetics and mechanism of a fast leuco-Methylene Blue oxidation by copper(II)-halide species in acidic aqueous media / O. Impert, A. Katafias, P. Kita [et al.] // *Dalton Trans.* – 2003. – N 3. – P. 348–353.
70. de Tacconi N.R. Reversibility of photoelectrochromism at the TiO₂/Methylene Blue interface / N.R. de Tacconi, J. Carmona, K. Rajeshwar // *J. Electrochem. Soc.* – 1994. – V. 144, N 7. – P. 2486–2490.
71. Talrose V., Yermakov A.N., Usov A.A., Goncharova A.A., Leskin A.N., Messineva N.A., Trusova N.V., Efimkina M.V. UV/Visible Spectra // NIST Chemistry WebBook: NIST Standard Reference Database Number 69 / P.J. Linstrom, W.G. Mallard (Eds.); National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899, (retrieved May 26, 2017).
72. Парадоксальный вторично-эмиссионный масс-спектр лейкоформы красителя метиленового синего / М.В. Косевич, О.А. Боряк, В.С. Шелковский и др. // VI Всеросс. конф. “Масс-спектрометрия и её прикладные проблемы”, 12–17 октября 2015, Москва, РФ. - 2015, С. 109. / *Paradoksal'nyj vtorichno-emissionnyj mass-spektr lejkoformy kresitelya mtilenovogo sinego / M.V. Kosevich, O.A. Boryak, V.S. Shelkovskiy [et al] / VI Vseross. konf. “Mass-spektrometria i ee prikladnye problemy”, October 12-17, 2015, Moscow, RF.* – 2015, S. 109.
73. Сайт: Новости СПбГУ. Дисульфидные мостики: от биофизики белков к онкогенезу – Mode of access: WWW.URL: <http://spbu.ru/news-spsu/24083-disulfidnye-mostiki-ot-biofiziki-belkov-k-onkogenezu> – Last access: May 26, 2017. – Title from the screen. / Site: Novosti SPbGU. Disul'fidnye mostiki: ot biofoziki belkov k onkogenezu - Mode of access: WWW.URL: <http://spbu.ru/news-spsu/24083-disulfidnye-mostiki-ot-biofiziki-belkov-k-onkogenezu> – Last access: May 26, 2017. – Title from the screen.
74. Origin of anti-tumor activity of the cysteine-containing GO peptides and further optimization of their cytotoxic properties / I.I. Tyuryaeva, O.G. Lyublinskaya, I.S. Podkorytov [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7. – Article ID 40217, 18 p.